

**Evaluación del efecto de Picloramo aplicado en el medio de cultivo a la inducción androgénica *in vitro* en el cultivo de anteras de yuca (*Manihot esculenta* Crantz), en el Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Palmira – Valle del Cauca.**

Carlos Alberto Ordoñez Peña

Código: 94315045

Proyecto presentado como requisito para optar al título de Especialista en Biotecnología Agraria

Coordinado por:

I.A., M.Sc. Oscar Eduardo Valbuena Calderón

UNIVERSIDAD NACIONAL ABIERTA Y ADISTANCIA - UNAD  
ESCUELA DE CIENCIAS AGRARIAS, PECUARIAS Y DEL MEDIO AMBIENTE  
ESPECIALIZACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA AGRARIA  
TRABAJO DE GRADO  
CEAD PALMIRA – 2017

**Evaluación del efecto de Picloramo aplicado en el medio de cultivo a la inducción ii  
androgénica *in vitro* en el cultivo de anteras de yuca (*Manihot esculenta* Crantz), en el  
Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Palmira – Valle del Cauca.**

Carlos Alberto Ordoñez Peña

Código: 94315045

Proyecto presentado como requisito para optar al título de Especialista en Biotecnología  
Agraria

Coordinado por:

I.A., M.Sc. Oscar Eduardo Valbuena Calderón

UNIVERSIDAD NACIONAL ABIERTA Y ADISTANCIA - UNAD  
ESCUELA DE CIENCIAS AGRARIAS, PECUARIAS Y DEL MEDIO AMBIENTE  
ESPECIALIZACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA AGRARIA  
TRABAJO DE GRADO  
CEAD PALMIRA – 2017

## NOTA DE ACEPTACIÓN

---

---

---

---

---

Firma del Presidente del jurado

---

Firma del jurado

---

Firma del jurado

**Dedicatoria**

Esta tesis se la dedico a Dios quién supo guiarme por el buen camino, darme fuerzas      iv  
para seguir adelante.

A mi familia quienes por ellos soy lo que soy, son mi motivación.

Y a mis amigos quienes siempre serán una bendición, que no tengo palabras que los describan, poder contar y disfrutar con ellos en la vida.

.

## **Agradecimientos**

v

Doy gracias a Dios por las oportunidades que nos da en la vida, por los amigos que encontramos, los que llegan y se van, pero nunca olvidamos. Un especial agradecimiento con la Dr. Elzbieta Golemić por la amistad que me ofrece de manera desinteresada a lo largo de cada día porque de no haber sido por su apoyo no habría podido superar los momentos más difíciles que he tenido que enfrentar, por su espíritu y sus enseñanzas las cuales estarán siempre conmigo.

El regulador de crecimiento vegetal Picloramo, ha sido probado exitosamente en la producción de embriogénesis somática de yuca. En este trabajo de estudio se evaluó la respuesta androgénica del Picloramo usado en diferentes concentraciones en el medio de inducción androgénica con el uso de la técnica de Cultivo de Anteras (CA) de dos genotipos de yuca. En este estudio se establecieron seis tratamientos, cuatro concentraciones de la hormona Picloramo y dos tratamientos de control, un control absoluto, sin hormona y control positivo la hormona 2,4-D que es evaluada exitosamente en la técnica de CA; así, la respuesta androgénica de la hormona Picloramo en las anteras de yucas tratadas y la respuesta evaluada son callos inducidos y originados desde células gametofíticas en esta técnica. Estos callos fueron analizados morfológicamente, se observó la forma y color de la anteras para determinar el crecimiento del callo al interior de la antera y la forma y color del callo al momento de emerger, los datos fueron registrados por un periodo de cuatro meses a intervalos de quince días, tomando el número de callo por antera para el análisis estadístico factorial  $2 \times 6 \times 3$  (genotipos  $\times$  tratamientos  $\times$  repeticiones en el tiempo) y al final se evaluó el nivel de ploidía mediante la citometría de flujo. El ensayo fue realizado en el laboratorio de Dobles Haploides (DH) del CIAT, bajo condiciones controladas en cultivo de tejidos in vitro. Las plantas donadoras fueron seleccionadas, por su interés comercial y por la buena floración el cual es un factor limitante en la tecnología explorada, CA, así como la exploración de una auxina el cual puede optimizar este proceso. Las respuestas al cultivo de anteras mostraron un crecimiento más rápido del tejido somático que de las células gaméticas por lo cual se hizo necesario remover este tejido durante el cultivo; el análisis de varianza mostro que dentro

del genotipo TMS 60444 que no hay diferencia significativa, pero fue significativo entre vii los genotipos y a mayor concentración para el genotipo SM 1219-9. Fue claro, en este trabajo, que para determinar el nivel de ploidía es necesario la aplicación de marcadores moleculares.

**Palabras claves:** Androgénesis picloramo, cultivo de anteras (DH) y haploidía.

## **Abstract**

The plant growth regulator Picloramo, has been successfully tested in the production of somatic embryogenesis of cassava. In this study we evaluated the androgenic response that was the effect of Picloramo using in different concentrations in the medium of androgen induction in the Anthers Culture (AC) of two cassava genotypes. In this study six treatments were established four concentrations of the Picloramo hormone and two absolute control treatments, without hormone and positive control the hormone 2,4-D that is evaluated successfully in the AC technique; thus, as the androgenic response of the hormone Picloramo in the anthers of cassava treated and the evaluated response are calluses induced and originated from gametophytic cells in this technique. These calluses were analyzed morphologically, the shape and color of the anthers were observed to determine the growth of the callus inside the anther and the shape and color of the callus at the time of emergence, the data were recorded for a period of four months at intervals of fifteen days, taking the callus number per anther for statistical analysis factorial  $2 \times 6 \times 3$  (genotypes  $\times$  treatments  $\times$  repetitions in time) and at the end the level of ploidy was assessed by flow cytometry. The proposed test was performed in CIAT's Double Haploid (DH) laboratory. In the DH laboratory all assays were performed under controlled conditions in in vitro tissue culture. The donor plants have been selected for their commercial interest and good flowering which is a limiting factor in the technology explored, as well as the exploration of an auxin which can optimize this process. The response to the AC showed a faster growth of the somatic tissue that of the gametic cells for which it became necessary to remove this tissue during the culture; the analysis of variance showed that within the genotype TMS 60444 there is no significant difference,



but it was significant among the genotypes and at a higher concentration for the genotype ii SM 1219-9. It was clear, in this work, that to determine the level of ploidy, the application of molecular markers is necessary.

**Keywords:** Androgenesis, picloram, anther culture (DH) and haploidy.

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. OBJETIVOS .....	3
2.1 General: .....	3
2.2 Específicos:.....	3
3. REVISIÓN DE LITERATURA .....	4
3.1 El Cultivo de la Yuca: Taxonomía, Importancia y características de la yuca. 4	
3.1.1 Taxonomía.....	4
3.1.2 Importancia de la Yuca. ....	4
3.1.3 Características Morfológicas de la yuca. ....	4
3.2 Microsporogénesis y Microgametogenesis: .....	6
3.3 Androgénesis en cultivo in vitro de anteras .....	8
3.4 Producción de plantas haploides y dobles haploides y su importancia el mejoramiento .....	9
3.5 Androgénesis en el cultivo de anteras (CA) .....	10
3.5.1 Factores que inciden en el cultivo de anteras.....	11
3.6 Componentes de Medios de cultivo: .....	13
3.7 Estadio de desarrollo de la microspora óptimo para el en Cultivo de Anteras de yuca.....	14
3.8 Estimación del nivel de ploidía por citometría de flujo:.....	15
4. MATERIALES Y METODOS .....	17
4.1 Localización: .....	17
4.2 Material vegetal .....	17

4.2.1 Composición y preparación del medio de cultivo .....	18iv
4.3 Etapas para el establecimiento del cultivo de anteras de yuca .....	20
4.3.1 Cosecha de las inflorescencias: .....	20
4.3.2 Selección y esterilización de los botones florales: .....	20
4.3.3 Pre-tratamiento de los botones florales: .....	21
4.3.4 Cultivo de anteras: .....	21
4.4 Evaluación morfológica de anteras cultivadas y las estructuras androgénicas (callos obtenidos en el cultivo de anteras <i>in vitro</i> ) .....	22
4.5 Evaluación de la respuesta androgénica en el cultivo in vitro de anteras de yuca.....	22
4.6 Evaluación de nivel de ploidía de estructuras androgénicas mediante citometría de flujo. ....	23
4.7 Diseño experimental y análisis estadístico .....	24
5. RESULTADOS .....	26
5.1 Evaluación morfológica de anteras cultivadas y las estructuras androgénicas / callos obtenidos en el cultivo de anteras <i>in vitro</i> .....	26
5.2 Evaluación de la respuesta androgénica en el cultivo in vitro de anteras de yuca.....	28
5.3 Evaluación de nivel de ploidía de estructuras androgénicas / callos originados en el cultivo de anteras mediante citometría de flujo .....	30
6. DISCUSIÓN.....	32
6.1 Progreso en la fase de inducción de la androgénesis .....	32
6.2 Dependencia de la eficacia de los cultivos androgénicos del genotipo .....	33

6.3 El efecto de las auxinas sobre la eficiencia de androgénesis .....	34 <sup>v</sup>
6.4 Nivel de ploidía de estructuras androgénicas / callos en el cultivo de anteras. .....	36
7. CONCLUSIONES.....	38
8. Bibliografía.....	39

## Lista de Tablas

Tabla 1 Taxonomía de la Yuca .....	4
Tabla 2 Componentes del medio basal NLN de inducción androgénica de yuca.....	18
Tabla 3 Tratamientos hormonales aplicados en el ensayo.....	19
Tabla 4 Esquema del ensayo; material vegetal y concentraciones de las hormonas aplicadas en el experimento, control absoluto - sin hormona, control positivo - 2,4-D 8 mg/L y tratamientos de Picloramo- 8 12, 16 y 20 mg/L. ....	25
Tabla 5 Análisis de varianza de la influencia del genotipo y efecto del medio de inducción androgénica con Picloramo.....	28
Tabla 6 Eficiencia de inducción de androgénesis observadas en las variedades SM 12199 y TMS 60444 en medio de inducción suplementado con diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento.....	28

Ilustración 1	Características de la planta de yuca: (a) Arquitectura (b) Ramificación e (c) Inflorescencia de la planta. ....	5
Ilustración 2	Flores de la planta de yuca: (a) Flor femenina; (b) Flor masculina; Fuente: Ceballos et al, (2002) .....	6
Ilustración 3	Proceso del desarrollo del grano polínico (Gonzales, 2016) .....	8
Ilustración 4	Proceso de androgénesis mostrando las dos posibles rutas de inducción de androgénesis: directa e indirecta (Torres, 2012).....	9
Ilustración 5	Callos producidos de tejido somático. ....	27
Ilustración 6	Producción de callos emergidos del saco polínico potencialmente haploide de las anteras de yuca; (a) Callo emergiendo de la variedad SM 1219-9 del tratamiento positivo 8 mg / L de 2,4-D. (b, c, d) Producción de callos en tratamiento con Picloramo 20 mg /L. (e, f, g, h, i) Picloramo con 16 mg/L. ....	27
Ilustración 7	La figura muestra los valores promedios y su comparación en la producción de callos en la eficiencia de la inducción de androgénesis en el cultivo de anteras de dos líneas (SM1219-9 y TMS 60444) con seis diferentes tratamientos, dos reguladores de crecimiento: 2,4-D 8 mg/L- control positivo y las diferentes concentraciones de Picloramo (P8= 8 mg/L, P12= 12 mg/L, P16= 16 mg/L, P20= 20 mg/L) y un control absoluto - sin hormona.....	29
Ilustración 8	Análisis de histogramas de Fluorescencia (UV) del nivel de ploidía. (A) Histograma de la calibración del equipo, (B) Histograma de nivel de ploidía obtenido de la muestra control de genotipo- hoja (C) Histograma de nivel de ploidía obtenido de muestra control del genotipo– callo somático originado de la hoja. (D) Histograma de nivel de ploidía	

obtenido de la muestra apropiada - callo de origen gametofítico, originado desde la antera.iii

..... 31

El cultivo de la yuca es considerado un alimento de importancia en seguridad alimentaria dentro de los vegetales que aportan energía a las comunidades a nivel mundial. En Colombia se producen cerca de 2 millones de toneladas de raíz al año del cual el 50% proviene de la región Caribe. El cultivo de la yuca es muy utilizado en las zonas marginales por los pequeños agricultores los cuales están en situaciones más desfavorecidas para el establecimiento del cultivo. La yuca se adapta a diferentes condiciones geográficas, tolera sequías y puede adaptarse a los cambios climáticos de las diferentes zonas, siendo importante la optimización del cultivo especialmente en aspectos nutricionales, mecanización, fertilización del cultivo, manejo de plagas, enfermedades y en el mejoramiento de los rendimientos de la yuca para asegurar la alimentación en zonas marginales (Meza, 2015); (Aguilera, 2012)

El mejoramiento convencional de *Manihot esculenta* Crantz realiza esfuerzos para contrarrestar las limitantes en la productividad del cultivo. La yuca presenta diferentes dificultades en el mejoramiento convencional como la alta heterocigocidad y una poca producción de semilla viable en los cruces realizados, las cuales representan una gran limitante para el mejorador en la obtención de una línea pura. Otros factores limitantes en el mejoramiento de yuca son: la duración del ciclo vegetativo de las plantas, la gran carga genética y la heterosis natural de los padres (Ceballos H. F., 2007).

A través del cultivo de tejidos vegetales, se busca la posibilidad de reducir los problemas que se presentan bajo el esquema del mejoramiento convencional de yuca. Entre las posibles soluciones está el empleo de plantas dobles haploides obtenidas a través de diferentes técnicas: por cruzamientos interespecíficos, androgénesis (el cultivo de anteras o



de microspora) o ginogénesis (cultivo de ovarios) en el cultivo in vitro (Foster, 2007). 2

Pero la introducción de líneas de dobles haploides (líneas completamente homocigóticas) en el proceso de mejoramiento sólo puede ser posible con un protocolo eficiente para la producción de líneas haploides con un sistema de buen rendimiento en la duplicación de los cromosomas.

La inducción de androgénesis a partir del cultivo de anteras es considerada como un método común para la obtención de plantas haploides de forma rutinaria en muchos cultivos. Este método ha sido utilizado con éxito en los programas de mejoramiento en casi todos los cultivos de importancia económica durante los últimos 20 años alrededor del mundo (Kurt O. E., 1996), 1996; (Sidhu, 2009); (Castillo A. N., 2013); (Serrata, 2014); (Ferrie, 2014).

Las ventajas de la técnica de Cultivo de Anteras (CA) en la producción de dobles haploides mediante técnicas de cultivo de tejidos ofrece interesantes ganancias como son reducir el tiempo y costos para obtener plantas dobles haploides, obteniendo el 100% de homocigosis y reducción de la carga genética en las plantas; por tanto, la disponibilidad de líneas homocigotas desde cultivo de anteras permitiría mejorar y aumentar producción del cultivo de yuca (Ceballos H. F., 2007).

En el programa de mejoramiento de yuca la herramienta biotecnológica de la producción de DH no ha sido bien establecida, por eso en la propuesta se explora el efecto de auxinas aplicadas para la diferenciación celular a fin de optimizar el protocolo de cultivo de anteras. Se investigará la respuesta de diferentes concentraciones de Picloramo en el cultivo de anteras de las dos variedades de yuca: SM-1219-9 y TMS 60444.

### 2.1 General:

Evaluar el efecto de Picloramo aplicado en el medio de inducción de androgénesis, en el cultivo de anteras de Yuca (*Manihot esculenta* Crantz), en el Centro Internacional de Agricultura Tropical – CIAT, Palmira – Valle del Cauca.

### 2.2 Específicos:

- ✓ Evaluar cambios morfológicos de las anteras cultivadas y de los callos inducidos in vitro durante la fase de inducción androgénica en el cultivo de anteras de Yuca.
- ✓ Evaluar la producción de callos androgénicos en anteras de Yuca cultivadas en medio de inducción suplementado con diferentes concentraciones de Picloramo.
- ✓ Evaluar el nivel de ploidía de estructuras androgénicas, callos originados en el cultivo de anteras, mediante citometría de flujo.

### 3.1 El Cultivo de la Yuca: Taxonomía, Importancia y características de la yuca

#### 3.1.1 Taxonomía.

*Tabla 1 Taxonomía de la Yuca*

Familia:	Euphorbiaceae
Subfamilia:	Crotonoideae
Tribu:	Manihoteae
Género:	Manihot
Especie:	<i>Manihot esculenta</i> Crantz

Fuente: (Ceballos H. C., Cassava Taxonomy and Morphology, 2012)

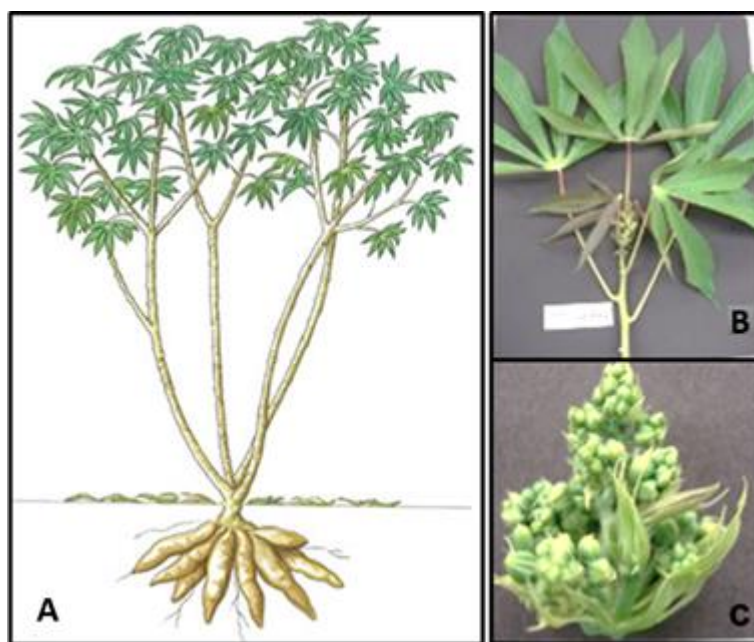
#### 3.1.2 Importancia de la Yuca.

La yuca (*Manihot esculenta* Crantz) está emergiendo como un alimento básico de importancia para la alimentación, además de la participación de la familia en las actividades agrícolas en muchos países en desarrollo de los trópicos. Más de dos tercios de la producción total de este cultivo son para la alimentación humana y en una menor cantidad son usadas como alimento de animales y propósitos industriales (Meza, 2015). El cultivo de la yuca es producido principalmente por pequeños agricultores en tierras marginales y humedales del trópico, siendo la yuca un cultivo muy eficiente en la producción de carbohidratos y un amplio rango de adaptabilidad tolerante a sequía y suelos ácidos (Philipp, 2006).

#### 3.1.3 Características Morfológicas de la yuca.

La arquitectura de la planta de yuca se basa en un tallo primario y que eventualmente produce ramificaciones que pueden ser reproductivas (flores masculinas y femeninas) o vegetativas (ramas laterales), utilizando la segunda para la producción y multiplicación del material.

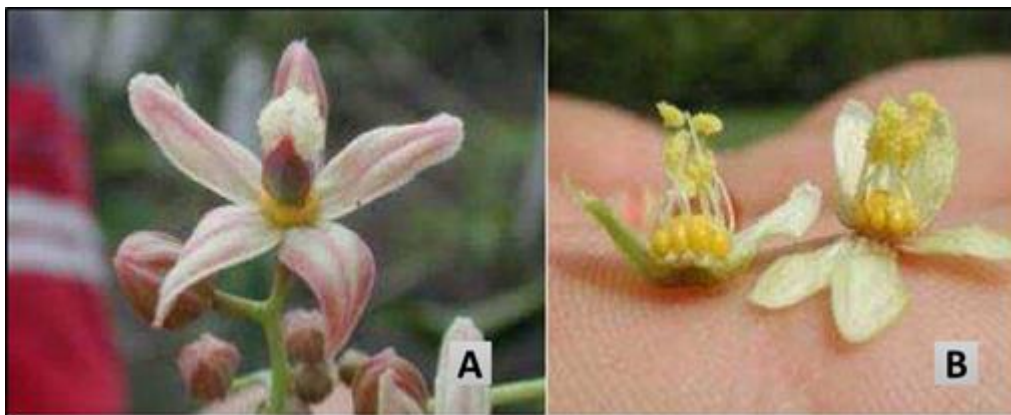
La planta de yuca es de ramificación simpodial y arbustivo, donde su altura se encuentra en un rango de 1 a 5 metros dependiendo de las condiciones del cultivo y del material como se observa en la figura 1, la yuca posee yemas axilares permitiendo su ramificación y en cada una de ellas se da la floración del cultivo (Ceballos H. C., 2012).



*Ilustración 1 Características de la planta de yuca: (a) Arquitectura (b) Ramificación e (c) Inflorescencia de la planta.*

### **3.1.3.1 Biología floral**

La yuca es una planta de tipo monoica con flores unisexuales masculinas y femeninas en la misma planta y generalmente en la misma inflorescencia. Las flores de la yuca se producen en inflorescencia conformada por un racimo de flores donde encontramos más flores masculinas que femeninas. Desde el punto de vista botánico puede definirse como un racimo de racimos, compuesto por un racimo principal que contiene racimos secundarios; en la generalidad de los casos, las inflorescencias se forman de yemas en el punto de inserción de las ramificaciones reproductoras (Ceballos H. C., 2012).



*Ilustración 2 Flores de la planta de yuca: (a) Flor femenina; (b) Flor masculina; Fuente: Ceballos et al, (2012)*

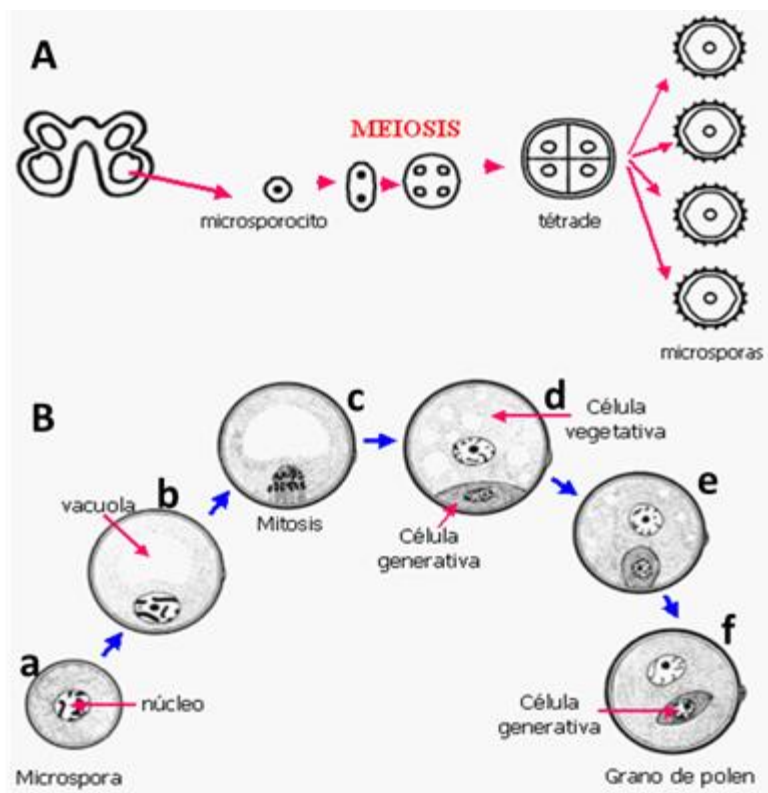
La yuca es una planta monoica, las flores femeninas y las masculinas están presentes en la misma inflorescencia, pero separadas (Figura 2), tanto la flor femenina (Figura 2A) como la masculina (Figura 2B); presentan una arquitectura muy sencilla debido a que, no presentan ni cáliz, ni corola, sino una estructura indefinida denominada perianto, compuesto de cinco tépalos (estructura intermedia entre sépalos y pétalos en las flores completas). La flor masculina posee diez anteras cada una compuesta de cuatro sacos polínicos donde se forman granos de polen. La producción de flores no es la misma en todas las variedades de yuca y entre ellas hay diferencias en tiempos de floración y cantidad de flores producidas (Ceballos H. C., 2012).

### **3.2 Microsporogénesis y Microgametogenesis:**

La reproducción sexual de las plantas comienza con la formación de los gametos tanto masculinos como femeninos, los cuales contiene la mitad de la información genética de la especie (Wang, 2010).

La microsporogénesis es la gametogénesis masculina, por tanto, es el proceso de formación desde un microsporocito (célula madre) contenidos en el saco polínico, las cuales son diploides ( $2n$ ) y en el proceso de la meiosis se dividen sucesivamente dando lugar a una tétrada conformada por cuatro microsporas uninucleados que contienen la mitad de la información genética ( $n$ ) de la célula madre (figura 3A).

Posteriormente la microspora pasan diferentes etapas de su desarrollo terminando en la formación del grano polínico (figura 3B), el cual comprende las siguientes etapas: a) uninucleado temprano, cuando la doble pared de la microspora (intina y exina) no está bien conformada todavía y el núcleo está situado en el centro de la microspora; b) uninucleado medio, cuando la doble pared está bien definida y el núcleo comienza a desplazarse hacia un costado, debido a la presencia de una vacuola grande; c) uninucleado tardío, cuando el núcleo está localizado en el costado de la microspora, se presenta agigantado con pequeñas vacuolas nucleolares y listos para entrar en mitosis; d y e) después de la división mitótica la microspora entra en el estado binucleado el cual comprende de dos etapas: - el binucleado temprano se presenta inmediatamente después de la primera división mitótica del núcleo, formándose dos núcleos, uno vegetativo el cual generalmente es de mayor tamaño, y el generativo o espermático más pequeño; f) el binucleado tardío que es la etapa final para constituirse en el grano de polen conformado por gránulos de almidón en el citoplasma y su núcleo generativo pasa su segunda división mitótica conformándose un conjunto de tres núcleos haploides del cual toma el nombre de grano polínico, que es el gametofito masculino (Lentini, 1997).



*Ilustración 3 Proceso del desarrollo del grano polínico (Gonzales, 2016)*

### 3.3 Androgénesis en cultivo in vitro de anteras

La biotecnología ha aportado diferentes herramientas metodológicas para complementar los programas de mejoramiento, como son: la transformación genética, la hibridación somática y el cultivo de tejidos. La androgénesis hace parte de esta última herramienta la cual utiliza la totipotencia celular que posee las microsporas contenidas en el saco polínico de las anteras, para obtener plantas haploides (Murovec, 2004).

La androgénesis es la capacidad de desarrollo de una planta a partir de las microsporas contenidas en las anteras. Este proceso puede ser inducido en la microspora inmadura en el cultivo in vitro, cambiando su ruta de desarrollo después de la aplicación de un factor estresante, causando divisiones celulares. Androgénesis puede pasar mediante dos mecanismos: directa o indirecta; la directa es el desarrollo de la microspora a embrión,

para así llegar a la planta; la indirecta es cuando la microspora desarrolla un callo y después pasa por el estado de estructuras androgénicas (embriones) que después regeneran las plantas (Figura 4). Mediante esta técnica se puede obtener plantas haploides o plantas dobles haploides – completamente homocigotas (Nitsch, 1969).

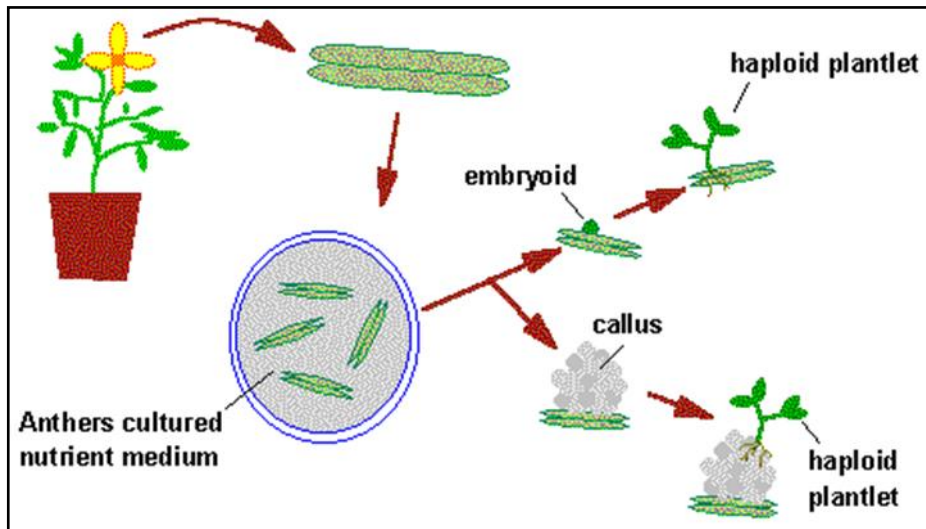


Ilustración 4 Proceso de androgénesis mostrando las dos posibles rutas de inducción de androgénesis: directa e indirecta (Torres, 2012).

### 3.4 Producción de plantas haploides y dobles haploides y su importancia en el mejoramiento

El descubrimiento de la obtención de plantas haploides esporofítica de forma espontánea en *Datura stramonium* en 1922, tuvo un gran impacto y un mayor desarrollo de los procedimientos *in vitro* para la producción de plantas haploides y dobles haploides. En el mundo de la biotecnología existen diferentes técnicas de obtención de plantas haploides y dobles haploides las cuales son: cruzamientos interespecíficos, androgénesis (el cultivo de anteras o de microsporas) o Ginogénesis (cultivo de ovarios) en el cultivo *in vitro* (Foster *et al*, 2007). La androgénesis a partir del cultivo de anteras es considerada como un



método común para la obtención de plantas haploides de forma rutinaria en muchos cultivos (Murovec, 2004). 10

Pero la introducción de líneas de dobles haploides (líneas completamente homocigóticas) en el proceso de mejoramiento sólo puede ser posible con un protocolo eficiente para la producción de líneas haploides con un sistema de buen rendimiento en la duplicación de los cromosomas (Wędzony M. F.-H., 2009).

La importancia y aplicación de líneas homocigotas – líneas de dobles haploides - en un programa de mejoramiento es en: (a) los cruzamientos para explotar el fenómeno de la heterosis (sobre-expresión de una o más características de importancia económica en las progenies); (b) facilitación de la expresión de rasgos recesivos; (c) reducción del tiempo necesario para la obtención de nuevas variedades debida a la carga genética y la naturaleza heterocigota de los padres; (d) desarrollo de marcadores moleculares (Ceballos H. F., 2007).

### **3.5 Androgénesis en el cultivo de anteras (CA)**

Androgénesis es definido como el proceso de generación de un individuo, cuya base genética es derivada exclusivamente de los núcleos de origen masculino (microsporas). Que en otras palabras las plantas regeneradas en este proceso son exclusivamente de origen masculinos precursores de gametos haploides (gametofítico). Esta ruta experimental, alternativa al desarrollo normal del polen, fue descubierta en 1964 por Guha y Maheshwari. Desde este tiempo mediante intensas exploraciones en este campo de la ciencia, la técnica de cultivo de anteras se ha convertido en el método más empleado para la obtención de plantas haploides / dobles haploides (Foster, 2007).

Durante los últimos 20 años alrededor del mundo este método ha sido utilizado con éxito en los programas de mejoramiento en casi todos los cultivos de importancia económica. En

el presente se encuentran más de 150 especies pasadas por esta técnica con una buena 11  
participación de cultivos comerciales como: arroz, cebada, trigo, papa, tabaco, coco, colza  
oleaginosa y maíz (Perera P. I., 2010); (kurt O. E., 1996); (Sidhu, 2009); (Castillo A. N.,  
2013); (Serrata, 2014); (Ferrie, 2014). Desafortunadamente entre estos cultivos no se  
encuentra el cultivo de yuca por causa que el protocolo de producción de DH por medio de  
cultivo de anteras, hasta ahora no ha sido bien establecido (Perera P. O.-L., 2013).

### **3.5.1 Factores que inciden en el cultivo de anteras**

La capacidad de respuesta androgénica en el cultivo de anteras, se evalúa por la  
cantidad de estructuras androgénicas y/o callos surgidos en la fase de inducción y por la  
cantidad de plantas verdes regeneradas en la fase de regeneración. En este proceso de  
androgénesis se reconocen los factores que afectan la capacidad de respuesta androgénica.  
Entre los factores más conocidos que afectan el proceso de androgénesis se encuentran: El  
factor genético – (genotipo), el estado de desarrollo de la microspora en las anteras, Los  
factores ambientales – (condiciones de crecimiento de la planta donante), los factores de  
estrés: - aplicados a las Inflorescencias antes del establecimiento del cultivo - nombrado  
pre-tratamientos (bajas y altas temperaturas) y aplicados en el cultivo de las anteras  
(componentes del medio: hormonas, carbohidratos; característica química del medio:  
osmolaridad) (Wędzony M. F.-H., 2009); (Mishra, 2016); (Bagheri, 2008).

#### **3.5.1.1 El genotipo:**

Entre los factores reportados hasta el momento, el genotipo es uno de los principales  
factores genéticos que afectan la respuesta androgénica en el cultivo de anteras in vitro  
(Mishra, 2016); (kurt O. E., 1996). Trabajos realizados en cultivo de anteras de arroz con  
las líneas japónicas de riego comparadas con líneas indicas y japónicas de secano

mostraron la importancia del genotipo; en los cuales las líneas japónicas de riego 12 presentaron una mayor producción de callos androgénicos y posteriormente regeneración de plantas verdes (Lentini, 1997); (Bagheri, 2008). Estudios hechos en plantas *Miscanthus sinensis* hierba ornamental donde el genotipo tenía un efecto significativo en el número de callos producidos (Głowacka, 2012). El mismo efecto de importancia del genotipo fue reportado para otras especies de importancia económica como: trigo, triticale, cebada (Immonen, 1996); (Kasha, 2003); (Małuszyński, 2003); (Datta, 2005); (Wędzony M. F.-H., 2009).

#### **3.5.1.2 Los factores ambientales:**

El crecimiento y las condiciones de desarrollo de la planta donante es importante entre los factores, un buen desarrollo de la planta está relacionada a la eficiencia de la respuesta androgénica. La planta donadora debe de estar libre de insectos, plagas, enfermedades. Las condiciones ambientales como deficiencias de nutrientes, hídricas, térmicas, humedad y fotoperiodo, todos los factores mencionados anteriormente afectan la eficacia de la inducción androgénica (Lentini, 1997); (Małuszyński, 2003); (Datta, 2005); (Wędzony M. F.-H., 2009).

#### **3.5.1.3 Los factores de estrés:**

Los pre-tratamientos de diversos tipos se dan a los órganos florales para inducir estrés que en última instancia puede redireccionar el desarrollo celular de las microsporas desde la dirección gametofítico (natural desarrollo del grano de polen) para la dirección esporofítica (inducidas divisiones celulares las cuales siguen hasta producir estructuras androgénicas o callos). Los pre-tratamientos de uso general son choques térmicos como las temperaturas altas y bajas (Małuszyński, 2003); (Datta, 2005); (Wędzony M. F.-H., 2009).

### 3.6 Componentes de Medios de cultivo:

13

La composición de los medios aplicados es un elemento muy importante que tiene un impacto definitivo en el curso del proceso de androgénesis. En el resultado final de los cultivos androgénicos no solo afecta la presencia del componente del medio (la calidad), sino también los componentes individuales (cantidad y proporción) los genotipos que fueron considerados como resistentes a androgénesis después del cambio de la composición del medio dieron una buena respuesta (Małuszyński, 2003); (Marciniak, 2003); (Datta, 2005); (Wędzony M. F.-H., 2009).

Los medios usados en cultivo de tejidos vegetales están compuestos por diferentes componentes tales como: sales, vitaminas, aminoácidos, reguladores de crecimiento (fitohormonas), azúcares, agentes solidificantes (agar, Gellan - gelrite y phytigel -), y agua bi-destilada (Lentini, 1997). Todos los mencionados componentes cumplen importantes funciones en el crecimiento o desarrollo de las plantas *in vitro*. Desde todos los componentes mencionados las auxinas son los componentes fundamentales para la inducción de androgénesis.

En los estudios realizados por (Perera P. O.-L., 2013) en cultivo de anteras de yuca usando el medio MS suplementado con 2,4-D 8mg/L fue posible la inducción de estructuras embriónicas. Trabajos realizados por (Ochoa, 2012) muestra resultados exitosos para producción de embriogénesis somática en el cultivo de yuca, usando medios MS y DKW suplementados con Picloramo a una concentración de 12 mg/L siendo más eficiente que 2,4-D y Di-camba para la producción de embriones somáticos. En el estudio de (Chirinos, 2006) en el cultivo de anteras de líneas dulces y amargas de yuca fueron exitosamente probados los medios MS y N6 suplementados con ANA y sulfato de cobre. Trabajos realizados por (Żur, 2013) han probado el Picloramo en combinación con

hormonas como dicamba y kinetina con el medio base KFWC, obteniendo buenos resultados en el cultivo de *Miscanthus × giganteus* una gramínea de uso industrial. En el cultivo de *Borago officinalis*, trabajo reportado por (Abdollahi, 2017), las plantas de borraja utilizada en la alimentación como verdura en los países europeos y de uso medicinal, la agro-biotecnología ha logrado producción de plantas DH en el cultivo *in vitro* usando el picloramo y este en combinación con las hormonas 2ip (2-isopentenil adenina) y 2,4-D (Ácido 2,4-diclorofenoxiacético)

### **3.7 Estadío de desarrollo de la microspora óptimo para el en Cultivo de Anteras de yuca**

En el momento de hacer la siembra del cultivo de anteras los diferentes autores indican que el desarrollo de la microspora es un factor determinante para la respuesta androgénica (Marciniak, 2003); (Datta, 2005); (Wędzony M. F.-H., 2009). (Lentini, 1997), determinó que, en arroz, el estado de desarrollo de la microspora óptimo para el cultivo de anteras es el uninucleado medio a tardío. Muchos otros autores confirmaron en sus trabajos el mismo estado de desarrollo como óptimo para inducción de androgénesis (Marciniak, 2003); (Datta, 2005); (Wędzony M. F.-H., 2009).

Para facilitar el trabajo en el cultivo de anteras *in vitro* en muchas especies se estableció un correcto estado de desarrollo de la inflorescencia que corresponde con el estado de desarrollo de la microspora, óptimo para la androgénesis. Por ejemplo, en el trabajo de (Lentini, 1997) se estableció las características morfológicas de la panícula, cual son asociadas al estado de desarrollo de dichas células. En estudios realizados por (Perera P. I., 2008) en el cultivo de anteras de Coco, reportaron que estado correcto para la cosecha de la inflorescencia fue después de su apertura (en la tercera semana), este estado correlaciono el óptimo estado de desarrollo de las microsporas para androgénesis. En

Yuca, (Chirinos, 2006) establecieron que las anteras que provienen de botones florales 15 de tamaño entre 1 a 1.5 mm fueron en un punto óptimo de desarrollo para iniciar el cultivo de anteras. Los tamaños de los botones florales establecidos por Chirinos no corresponden con el establecimiento de ensayos realizados por (Wang, 2010) y (Perera P. Q., 2012), en donde se estimó que el estado de desarrollo de la microspora, óptimo en yuca para la androgénesis fue correlacionado con botones florales de tamaños entre 2.1 a 2.6 mm. Estas diferencias pueden resultar en los diferentes cultivares ensayados.

### **3.8 Estimación del nivel de ploidía por citometría de flujo:**

La estimación del nivel de ploidía es una técnica esencial en el mejoramiento y la genética de las plantas. Determinación de ploidía se utiliza ampliamente en las plantas regeneradas a partir de cultivo de tejidos, por causa de que la variación de ploidía es muy común en condiciones *in vitro* (Cramer, 1999).

Existen varias técnicas que están disponibles para la determinación del nivel de ploidía por ej.: las macroscópicas diferencias morfológicas de plantas, el conteo de cromosomas y citometría de flujo. Durante los últimos años, la citometría de flujo se ha establecido como un método novedoso útil, para determinar - de manera rápida, eficiente, reproducible y a un costo reducido por muestra - el contenido relativo de ADN nuclear y el nivel de ploidía de un gran número de especies (plantas y animales) (Ochatt S. , 2006).

Básicamente, el citómetro de flujo es compuesto de parte fluidica, óptica y electrónica. En el proceso de medición las células / núcleos (teñidas con un fluorocromo) fluyen separadas en una suspensión a través de un volumen iluminado en el que dispersan la luz y emiten una fluorescencia que se recoge, se filtra y se convierte a valores digitales para el almacenamiento en la computadora (Robinson, 2006).

En primer lugar, el uso más frecuentemente reportado de citometría de flujo en la 16 literatura ha sido analizar el nivel de ploidía de los individuos obtenido después de experimentos de inducción androgénica, haplo-diploidisation o duplicación de cromosomas por medio de colchicina (Ochatt S. M., 2002).

(Perera P. W., 2006) en su trabajo reportaron que por medio de citometría de flujo el nivel de ploidía de estructuras androgénicas de coco fue exitosamente analizado. El análisis reveló que todas las estructuras llamadas embrioides fueron de nivel de ploidía  $1n$  - haploide ( $n = x = 16$ ) que indica que los callos / embrioides fueron originados de las células gaméticas de las anteras. Estudios de nivel de ploidía - en estructuras androgénicas de yuca - analizados por citometría de flujo, han mostrado haploides y mixoploides, entre todas las muestras analizadas (Perera P. O.-L., 2013); (Dolezel, 2007) mostraron por citometría de flujo presencia de haploides e individuos con un nivel de ploidía  $2C$  que corresponde a diploide.

### 4.1 Localización:

El ensayo se realizó en el laboratorio de cultivo de anteras *in vitro* del Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) ubicado en Palmira – Valle del Cauca, 3° 16' latitud norte, 76° 32' longitud oeste y a una altitud de 965 msnm. El laboratorio mencionado cuenta con el cuarto de preparación de medios, cuarto frío con condiciones controladas (temperatura de 10 °C +/- 1°C), cuarto de transferencia con condiciones controladas (temperatura de 24 °C +/- 1°C) y equipado con cabina de flujo laminar - en el cual el motor hace circular el aire pasando por dos filtro EPA para asegurar un ambiente aséptico en la mesa de trabajo, y cuarto de crecimiento con incubadoras donde se almacenan los cultivos sin iluminación a una temperatura de 28°C constante.

### 4.2 Material vegetal

Las plantas donantes de botones florales utilizadas en el cultivo de anteras, fueron las variedades SM 1219-9 y TMS 60444 las cuales se seleccionaron por el programa de mejoramiento, por su amplia adaptación al ambiente, gran cantidad de flores, contraste en la floración, homogeneidad del material y su uso en cultivo de tejidos. SM 1219-9 es el resultado de poli-cruzamientos (polinización abierta) echas en 1998 con un solo progenitor femenino (CG 1450-4) derivados de variedades autóctonas conocidas como MCOL 1505 y MCOL 1940. El clon TMS 60444 este material ha sido usado como línea modelo para trabajos en transformación genética (Perera et al., 2012). Los clones de Yuca SM1219-9 y TMS60444 son materiales utilizados por el programa de mejoramiento y aprovechados para CA.



bajo condiciones naturales, de forma escalonada, sin aplicaciones químicas y realizando controles manuales para eliminar posibles patógenos e insectos plaga. El establecimiento del cultivo de yuca comienza con la selección de la semilla, se corta los tallos y se utilizan como material de inicio del cultivo en campo incluyendo el adecuado manejo agronómico (correcta fertilización y provisión de agua).

#### 4.2.1 Composición y preparación del medio de cultivo

**4.2.1.1 Composición del medio de cultivo:** Se utilizó el medio de inducción androgénica NLN, planteado por Perera *et al*, (2013), cuya composición se encuentra en la Tabla 2.

Tabla 2 Componentes del medio basal NLN de inducción androgénica de yuca.

Compound		g/L
KNO <sub>3</sub>		2
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O		0.125
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>		0.125
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>		1.25
C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> FeN <sub>2</sub> NaO <sub>8</sub>		0.0278
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O		0.019
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>		0.01
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O		0.01
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O		0.000025
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O		0.0003
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O		0.000025
Thiamine-HCl		0.0005
Pyridoxine-HCl		0.0005
Nicotinic Acid		0.005
Glycine		0.002
D-Biotin		0.00005
Folic Acid		0.0005
Glutathione		0.03
L-Glutamine		0.8
L-Serine		0.1

Fuente: (Perera P. O.-L., 2013)

**4.2.1.2 Preparación del medio:** Para la preparación del medio básico de cultivo, en un plato de agitación con un magneto se colocó el vaso precipitado de 2000 ml el cual se llenó a la mitad del volumen final del medio con agua bi-distilada; se agregaron todos los componentes básicos del medio (Tabla 1), fueron agitados hasta su completa dilución y al final fue aforado con agua bi-distilada a su totalidad. La solución preparada anteriormente se dividió en volúmenes iguales de 250 ml y fue suplementado con las auxinas de acuerdo con los tratamientos propuestos en la Tabla 2. El medio fue suplementado con dos fitohormonas: 2,4-D en una concentración de 8mg/L - como control positivo y Picloramo en cuatro diferentes concentraciones de 8, 12, 16 y 20 mg/L, se preparó también un medio NLN básico sin hormonas - como control absoluto. Los 6 tratamientos fueron marcados de uno a seis como se presenta en la tabla 2.

Posteriormente en todos los medios preparados se estableció el pH y se realizó la esterilización del medio.

*Tabla 3 Tratamientos hormonales aplicados en el ensayo*

<b>Tratamientos</b>	<b>Concentración de hormonas</b>	<b>Tipo de tratamiento</b>
T – 1	Sin hormona	Control absoluto
T – 2	Picloramo 8 mg/l	Tratamiento
T – 3	Picloramo 12 mg/l	Tratamiento
T – 4	Picloramo 16 mg/l	Tratamiento
T – 5	Picloramo 20 mg/l	Tratamiento
T – 6	2,4-D 8 mg/l	Control positivo

**4.2.1.3 Establecimiento de pH y esterilización del medio líquido:** Después de la preparación del medio, se estableció para todos los tratamientos el pH a 5,8 usando el medidor de pH (Thermo Orion 3 star) ajustándolo con las soluciones: - alcalina NaOH al 1N -o ácida de HCL al 1N.

El proceso de esterilización se realizó en cabina de flujo laminar por filtración, 20  
utilizando filtros Millipore de forma manual usando membranas con poros de 0,45  $\mu\text{m}$   
(Termo Scientific Nalgen, Rapid-Flow). El medio fue filtrado a través de los filtros  
mencionados a botellas de tapa rosca previamente esterilizadas. A todos los medios de  
cultivo se les adicionó un antibiótico sistémico inhibidor de síntesis de la pared celular de  
bacteria (Ticarcillin-clavulanate, Duchefa) para evitar la contaminación en el medio de  
cultivo.

#### **4.3 Etapas para el establecimiento del cultivo de anteras de yuca**

**4.3.1 Cosecha de las inflorescencias:** Para los ensayos planeados en el cultivo *in vitro*, el  
material vegetal se tomó de la tercera ramificación; las inflorescencias fueron colectadas  
entre 8 y 10 de la mañana, solamente de las plantas sanas y vigorosas con profusa  
floración, de similar morfología y estado de desarrollo. Las inflorescencias colectadas  
fueron inmediatamente transportadas en condiciones de frío (empacadas en bolsas plásticas  
y guardadas en cajas de icopor con un gel congelado Glacier Ice Co., Stockton, CA, USA),  
el propósito fue evitar la deshidratación de las flores y daños en este proceso.

**4.3.2 Selección y esterilización de los botones florales:** Posteriormente a la recolección  
del material del campo y tan rápido como fue posible, los botones florales fueron  
seleccionados de acuerdo con los tamaños florales propuestos por Wang *et al*, (2010) y  
Perera *et al*, (2013), las flores masculinas seleccionadas para el experimento oscilaron  
entre 2.3 y 2.6 mm (estadio de desarrollo de la microspora uninucleado tardío a binucleado  
temprano). Inmediatamente después de la selección de los botones florales se realizó la  
esterilización en la cámara de flujo laminar en condiciones estériles.

El proceso de esterilización fue compuesto por los siguientes pasos: 1) Los botones seleccionados fueron colocados en un beaker de vidrio con un colador para facilitar el proceso de esterilización, después de este paso al beaker fue aforado con etanol al 70% cubriendo completamente los botones florales; este tratamiento duro tres minutos. Seguido el colador con los botones florales fue transferido a otro recipiente; 2) continuando con el segundo paso de la esterilización se agregó hipoclorito al 10% al recipiente dejando actuar por veinte minutos con un recambio de igual solución a los diez minutos; 3) el último paso de este proceso fueron tres enjuagues con agua bi-destilada y esterilizada, cada uno de a un minuto. Después de la esterilización el material vegetal fue listo para el siguiente paso.

**4.3.3 Pre-tratamiento de los botones florales:** El material vegetal esterilizado fue colocado en condiciones asépticas en una caja Petri con un papel absorbente (Whatman N° 6), sellada con una película plástica y pre-tratado en cuarto frío a temperatura de 10 °C durante 5 días. Después el material vegetal fue retirado del cuarto frío y llevado al cuarto de transferencia, donde las anteras fueron aisladas de la flor y colocadas en el medio de cultivo.

**4.3.4 Cultivo de anteras:** Acorde con la metodología desarrollada por Perera *et al*, (2013), se realizó el aislamiento de las anteras, utilizando un estereoscopio Olympus SZ2-1LST. En el proceso fueron sembrados 40 anteras de 8 botones florales por caja Petri de 60 x 15 mm que contenían 10 ml de medio de inducción líquido NLN (Perera *et al*, 2013). Las cajas Petri fueron selladas e incubadas a 28 °C  $\pm$ 1 bajo condiciones de oscuridad (incubadora Percival cu56). En este trabajo cada caja Petri se consideró como una repetición en el tiempo. La siembra de los dos genotipos fue realizada al tiempo para

conservar las mismas condiciones del cultivo. Cada ensayo consto de seis tratamientos, 22 de los cuales cuatro contenían la hormona Picloramo en diferentes concentraciones, un control absoluto sin hormona y un control positivo el cual contenía la hormona 2,4-D. Los detalles de estos tratamientos se encuentran en la Tabla 2.

#### **4.4 Evaluación morfológica de anteras cultivadas y las estructuras androgénicas (callos obtenidos en el cultivo de anteras *in vitro*)**

Para la descripción morfológica de las anteras cultivadas y las estructuras androgénicas en la literatura no hay mucha información, por lo cual se realizó de acuerdo a la metodología de Ochoa et al., 2012; en el cual se utiliza el CEF (callo embriogénico friable) para la transformación genética en yuca desde callos somáticos; en este trabajo se propuso registrar el color y forma de las anteras sembradas en el medio de inducción, durante este periodo bajo un estéreo-microscopio Olympus SZ2-1LST. Se removieron los callos somáticos producidos desde el filamento de la antera y el tejido conector. Durante la fase de inducción androgénica, se realizaron observaciones periódicas quincenales por un periodo de cuatro meses; las estructuras androgénicas producidas desde la antera de yuca se le hicieron tomas de fotos para el registro del color y la forma de los callos buscando evidenciar el origen embriogénico de los callos.

#### **4.5 Evaluación de la respuesta androgénica en el cultivo in vitro de anteras de yuca**

Se evaluó la repuesta en el cultivo de anteras de la inducción androgénica de dos genotipos (TMS 600444 Y SM 1219-9) por el número de callos emergidos por antera sembrada en los diferentes tratamientos establecidos. Después de cuatro meses en la fase de terminación de inducción androgénica se contabilizaron el número de callos producidos desde la antera que dieron respuesta al tratamiento y se hizo las tomas de datos finales de la cantidad de callos por anteras sembradas, las cuales en el paso anterior fueron evaluadas

exitosamente, como resultado a la respuesta de origen gametofítico, que habló de la 23  
respuesta androgénica del cultivo. Posteriormente la estructura androgénica fue analizada  
su nivel de ploidía mediante la citometría de flujo.

#### **4.6 Evaluación de nivel de ploidía de estructuras androgénicas mediante citometría de flujo.**

Para determinar el nivel de ploidía de las estructuras obtenidas en el proceso de androgénesis se utilizó citometría de flujo. El material vegetal para el análisis fue preparado usando el kit de acuerdo al protocolo Flow Cystain UV Precise PARTEC, número del catálogo: 05-5002 (Pasqual *et al.*, 2012). Este protocolo consta de los siguientes pasos: 1) El aislamiento de los núcleos. En el proceso se colocó, aproximadamente 0.5 cm<sup>2</sup> de tejido de hoja (muestra control), tejido de callo originado de la hoja (muestra control, de variación somaclonal) y tejido de estructuras androgénicas / callo (muestras a evaluar) en una caja Petri plástica; después de la adición 400 µl de buffer de extracción, el tejido fue picado precisamente usando una hoja de cuchilla de afeitar afilada por 60 segundos. Para asegurar un buen procesamiento del tejido las hojas de afeitar fueron cambiadas después de cada 5 muestras. El tejido procesado en el paso anterior fue incubado por 5 minutos. Después de la incubación de la suspensión del tejido en el buffer de extracción, las muestras fueron filtradas a través de un filtro de nailon desechable de 50 µm a un tubo analítico (CellTrics código No: 04-0042-2317). 2) Tinción de núcleos. Al filtrado se agregó 1,6 ml del buffer de tinción con un fluorocromo 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI), la solución fue incubada por un periodo de media hora en oscuridad y posteriormente analizada en el Citómetro de flujo por el canal de fluorescencia (UV).

Los análisis del nivel de ploidía fueron realizadas usando el equipo CyFlow Space 24 citómetro de flujo (Sysmex America Inc., 2016) con el programa Flomax, las medidas fueron realizadas por la excitación de la fluorescencia UV por debajo de  $\lambda = 420\text{nm}$  y con una emisión de fluorescencia para DAPI entre  $\lambda = 435\text{ nm}$  y  $\lambda = 500\text{ nm}$ .

El proceso de medición de nivel de ploidía en el equipo mencionado, es hacer pasar los núcleos de forma individual por un sistema de fluido continuo (solución Shift), pasando por el sistema óptico que excita la fluorescencia de DAPI y la señal pasa por el detector, el cual hace los conteos de la señal de emisión fluorescente de los núcleos teñidos.

El primer paso en el proceso de medición es la calibración del equipo de acuerdo con la recomendación del protocolo de Partec, usando la solución de calibración suministrada por el proveedor del equipo. Posteriormente se realiza la medición de las muestras preparadas, en primera instancia fueron analizadas las dos siguientes muestras control: 1) - hoja del genotipo-, 2) callo somático inducido desde las hojas del genotipo analizado (control para variación somaclonal). Al final, se tomó análisis de las muestras apropiadas preparadas de las estructuras androgénicas / callos.

#### **4.7 Diseño experimental y análisis estadístico**

El diseño experimental es presentado en la Tabla 4. El ensayo fue realizado en tres siembras en el tiempo (tres repeticiones) para reducir el efecto del clima en la variable de respuesta (Número de callos inducidos). Los tratamientos se sembraron para evaluar la interacción del genotipo por la hormona. Para establecer cada tratamiento se seleccionaron ocho flores de las cuales se tomaron cinco anteras de cada flor, para asegurar completa aleatoriedad y homogeneidad dentro de cada repetición; por tanto, cada caja Petri con cuarenta anteras sembradas, fue tratada como una réplica, cada tratamiento fue

representado por tres réplicas. La población total de anteras sembradas para tres repeticiones era compuesta de ciento veinte individuos por cada tratamiento.

25

En el análisis estadístico para evaluar los datos de la respuesta androgénica en el cultivo de anteras con diferentes concentraciones de Picloramo se usó el diseño factorial  $2 \times 6 \times 3$  (genotipos  $\times$  tratamientos  $\times$  repeticiones en el tiempo) el cual permitió analizar el efecto de la hormona en cada tratamiento y comparar las dos variedades.

Con el diseño factorial, fue evaluado el efecto del genotipo, la concentración de la hormona y la interacción del genotipo por concentración de la hormona.

Mediante un análisis de varianza, con un error del 5%, usando el procedimiento Proc GLM del sistema SAS 9.3 para Linux.

*Tabla 4 Esquema del ensayo; material vegetal y concentraciones de las hormonas aplicadas en el experimento, control absoluto - sin hormona, control positivo - 2,4-D 8 mg/L y tratamientos de Picloramo- 8 12, 16 y 20 mg/L.*

GENOTIPO	TRATAMIENTO HORMONAL (fitohormona)	REPETICIONES
SM – 1219-9	T – 1 (Sin hormona)	3
	T – 2 (Picloramo 8 mg/L)	3
	T – 3 (Picloramo 12 mg/L)	3
	T – 4 (Picloramo 16 mg/L)	3
	T – 5 (Picloramo 20 mg/L)	3
	T – 6 (2,4-D 8 mg/L)	3
TMS 60444	T – 1 (Sin hormona)	3
	T – 2 (Picloramo 8 mg/L)	3
	T – 3 (Picloramo 12 mg/L)	3
	T – 4 (Picloramo 16 mg/L)	3
	T – 5 (Picloramo 20 mg/L)	3
	T – 6 (2,4-D 8 mg/L)	3



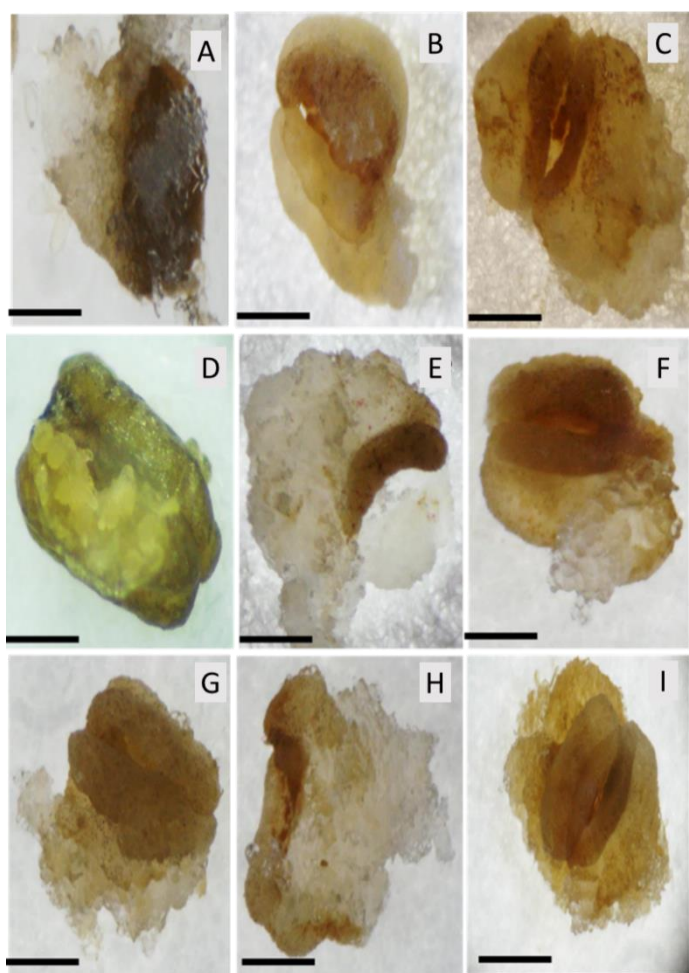
## 5. RESULTADOS

### 5.1 Evaluación morfológica de anteras cultivadas y las estructuras androgénicas / callos obtenidos en el cultivo de anteras *in vitro*

Durante el establecimiento del cultivo de anteras, se observó que las anteras seleccionadas y siguientemente diseccionadas presentaron un rango de colores entre verde transparente hasta amarillo claro. En el cultivo de anteras, durante el proceso de inducción de androgénesis se observó cambios en la apariencia de las anteras aisladas. Durante el proceso de inducción se podía observar oscurecimiento del color de las anteras y en la mayoría de ellas los sacos polínicos y los tejidos somáticos se estaban engrosando. La respuesta más rápida que se observó en el cultivo de anteras fue desde el tejido somático, (tejido conectivo, filamentos o de la pared de la antera de la yuca), después del primer mes se podía observar el desarrollando excesivo de callos somáticos – (Figura 6) los cuales no eran de interes del ensayo y fueron eliminados sistematicamente, permitiendo el desarrollo de callos de origen esperado. Pasando tres hasta cuatro meses de cultivo, se podía observar el desarrollo de callos de origen potencialmente haploide, que se estaban agrietando desde los sacos polínicos hinchados. Estas callosidades originadas no mostraron una apariencia embrioidal o de estructura compacta, pero estaban formando clusters sueltos de callos (Fig.7).



*Ilustración 5 Callos producidos de tejido somático.*



*Ilustración 6 Producción de callos emergidos del saco polínico potencialmente haploide de las anteras de yuca; (a) Callo emergiendo de la variedad SM 1219-9 del tratamiento positivo 8 mg / L de 2,4-D. (b, c, d) Producción de callos en tratamiento con Picloramo 20 mg /L. (e, f, g, h, i) Picloramo con 16 mg/L.*

## 5.2 Evaluación de la respuesta androgénica en el cultivo in vitro de anteras de yuca 28

En el presente ensayo como respuesta androgénica fue evaluado el número de callos emergidos de los sacos polínicos de las anteras.

Todo proceso de inducción de androgénesis que están mostrando los datos estadísticos en el análisis de varianza, fue significativamente dependiente del genotipo y también de algunos tratamientos (Tabla 4). Igualmente se observó diferencias significativas en la interacción variedad por tratamiento.

*Tabla 5 Análisis de varianza de la influencia del genotipo y efecto del medio de inducción androgénica con Picloramo.*

Evaluación de efectos fijos			
0Efecto	Número de grados de libertad DF	F Valor	Pr > F
Tratamiento	5	36,25	<.0001
Variedad	1	82,63	<.0001
Tratamiento*Variedad	5	4,55	0,0062

La eficiencia de inducción de callos en las variedades probadas, fue mayor en la variedad TMS 60444 (24.3%) con relación a SM 12-199 (7.7%), superándola en un 68.3% (Tabla 5).

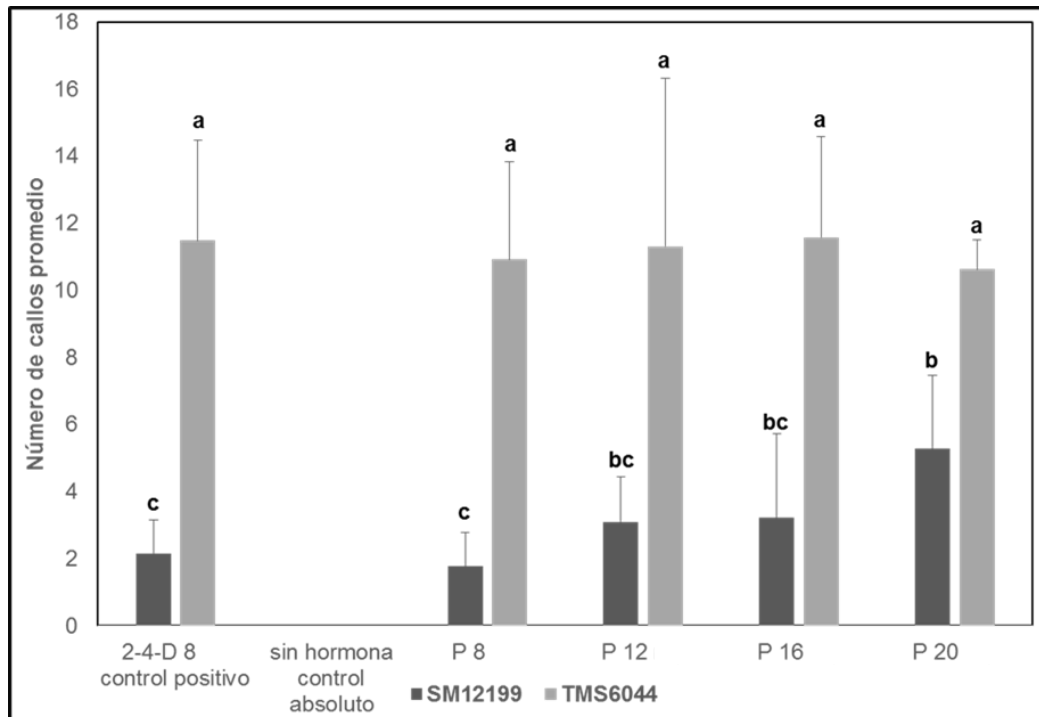
*Tabla 6 Eficiencia de inducción de androgénesis observadas en las variedades SM 12199 y TMS 60444 en medio de inducción suplementado con diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento.*

Tratamiento	SM12199	TMS60444
	(%) repuesta de la antera	
Picloramo 12mg	8,3	30,8
2-4-D 8mg	7,5	30,0
Picloramo 16mg	11,3	30,0
Picloramo 8mg	5,0	28,3
Picloramo 20mg	14,2	26,7
sin hormona	0,0	0,0

Acorde a la Figura 8, en la variedad TMS 60444 no se observaron diferencias

29

significativas entre los tratamientos probados con relación al control positivo. Por el contrario, en la variedad SM 1219-9 se observaron diferencias significativas, donde el tratamiento de Picloramo 20mg/L indujo la mayor cantidad de callos (5.28), superando al control positivo en un 59.1%.



*Ilustración 7 La figura muestra los valores promedios y su comparación en la producción de callos en la eficiencia de la inducción de androgénesis en el cultivo de anteras de dos líneas (SM1219-9 y TMS 60444) con seis diferentes tratamientos, dos reguladores de crecimiento: 2,4-D 8 mg/L- control positivo y las diferentes concentraciones de Picloramo (P8= 8 mg/L, P12= 12 mg/L, P16= 16 mg/L, P20= 20 mg/L) y un control absoluto - sin hormona.*

Para el experimento los valores de la prueba DMS de Fisher con una tasa de error individual de 0.05 (equivalente a un nivel de confianza de 95%) fue calculada, y se observó que en la variedad TMS 60444 no hay diferencias significativas entre tratamientos; mientras que en la variedad SM 1219-9 se observó diferencia significativa entre la

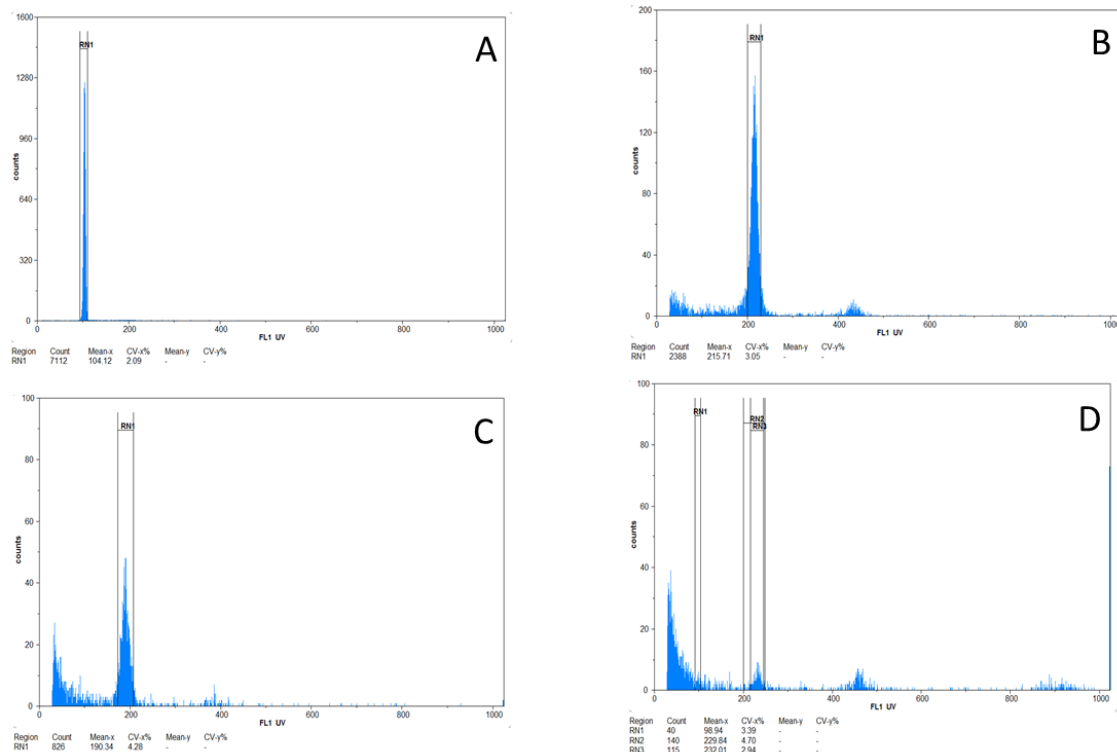
concentración más alta de Picloramo (T5) y el control positivo (T6). De igual manera se 30 detectó diferencia significativa entre los tratamientos con Picloramo T5 y T2. Acorde a la Figura 7, podemos inferir que para la variedad SM 1219-9 existe una relación directa entre la concentración de Picloramo y cantidad de callos inducidos.

### **5.3 Evaluación de nivel de ploidía de estructuras androgénicas / callos originados en el cultivo de anteras mediante citometría de flujo**

Para confirmar el nivel de ploidía de tejido de callos emergidos de los sacos polínicos de las anteras en el cultivo *in vitro*, fueron realizados los análisis de citometría de flujo. La figura 9 muestra ejemplos de histogramas de fluorescencia, los cuales presentan la forma en el cual se obtuvieron los resultados de los mencionados análisis.

Para confirmar el nivel de ploidía original de los genotipos evaluados, como control, se tomó la muestra de tejido de hojas y realizaron medidas de fluorescencia por cada uno de ellos. Por causas de las condiciones del cultivo *in vitro* en la medición se pudo inducir variación somaclonal; adicionalmente se utilizó muestra control de callos originados de hojas en condiciones *in vitro*. El análisis de fluorescencia de todos los tipos de muestras de los controles usados confirmó el nivel de ploidía 2C.

Todas las muestras de los callos originados en CA seleccionados de supuesto origen gametofítico, fueron analizados por citometría de flujo, independientemente del genotipo analizado, mostraron el nivel de ploidía 2C, que corresponde al nivel diploide. (Figura 9).



*Ilustración 8 Análisis de histogramas de Fluorescencia (UV) del nivel de ploidía. (A) Histograma de la calibración del equipo, (B) Histograma de nivel de ploidía obtenido de la muestra control de genotipo- hoja (C) Histograma de nivel de ploidía obtenido de muestra control del genotipo- callo somático originado de la hoja. (D) Histograma de nivel de ploidía obtenido de la muestra apropiada - callo de origen gametofítico, originado desde la antera.*

## 6. DISCUSIÓN

### 6.1 Progreso en la fase de inducción de la androgénesis

En los estudios presentados, el curso de la androgénesis fue típico de los cultivos de yuca. Los primeros callos fueron visibles alrededor de 4 meses de cultivo, lo cual es consistente con las observaciones de otros autores. (Prasanthi *et al*, 2013)

Al contrario, en el cultivo de anteras de diferentes cereales las primeras estructuras androgénicas fueron visibles alrededor de 4 semanas de cultivo. En los trabajos de Darvey *et al*, (1991) y Ślusarkiewicz-Jarzina y Ponitki (1997), las primeras estructuras aparecieron tres o cuatro semanas después del establecimiento del cultivo. En Charmet y Bernard (1984), Ryöppy (1997), estas estructuras podrían aislarse de las anteras entre la quinta y la séptima semana de cultivo. En todos estos estudios, la tasa de desarrollo de las estructuras androgénicas fue independiente del genotipo de la planta donante.

En este trabajo, las estructuras androgénicas emergidas en cultivo de anteras de yuca, se caracterizaron por su apariencia diversa. Algunos de ellos tuvieron una forma de tejido compacto de color crema y mate, otros estaban en forma de tejido suelto altamente hidratado y de color blanquecino. De manera similar Prasanthi *et al* 2014 en su trabajo muestran estructuras androgénicas/ callos muy parecidos en su apariencia.

En cultivo de anteras de otras especies los autores Lukjanjuk e Ignatova (1986) y Schumann (1990) mostraron también la apariencia diferenciada de las estructuras androgénicas obtenidas. Como se describe por Schumann (1990), se han observado tres tipos de callos en el cultivo de anteras: uno globular de estructura compacta, un callo suelto con centros más compactos y un callo completamente suelto y fuertemente hidratado de

color transparente. Lukjanjuk e Ignatova (1986) observaron en los cultivos dos tipos de callos: callo compacto de color blanco o cremoso y callo casi transparente con estructura suelta y tejido fuertemente hidratado. En los trabajos citados sólo las estructuras de diseño compacto mostraron capacidad regenerativa. 33

Aunque las primeras estructuras que aparecen en el cultivo de anteras se observaron sólo después de unas semanas, los estudios citológicos realizados en Schumann (1990) y González y Jouve (2005) en el cultivo de anteras de triticales mostraron que las primeras divisiones de microsporas que conducen a la formación de las estructuras androgénicas estaban ocurriendo ya en el tercer y cuarto día de cultivo. Por lo tanto, un período particularmente importante en el proceso de androgénesis son los primeros días del cultivo en el medio de inducción, durante el cual tienen lugar las primeras subdivisiones de microsporas inducidas, determinando posterior dirección de diferenciación de estas células. Como resultado de estas transformaciones, se forman estructuras androgénicas.

## **6.2 Dependencia de la eficacia de los cultivos androgénicos del genotipo**

La utilidad de cultivo de anteras para el proceso de mejoramiento de plantas y la investigación genética, en gran medida depende de la posibilidad de obtener alta eficiencia de androgénesis.

Uno de los factores que tienen una influencia dominante sobre la eficiencia de este proceso es el genotipo de las plantas donantes (revisado: Ryöppy 1997; Datta 2005).

Experimentos realizados en el presente estudio mostraron un efecto estadísticamente significativo del genotipo en la respuesta androgénica.

Del mismo modo, se observó la fuerte influencia del genotipo en los trabajos sobre androgénesis de varios tipos de cereales, entre otros: triticales (Eudes i Amundsen 2005), trigo (Moieni *et al*, 1997) y cebada (Cistué *et al*, 2003)



Dentro de una especie se puede observar fuerte variación en la susceptibilidad a androgénesis. Dentro de cada especie se puede encontrar genotipos resistentes a los métodos utilizados, y también genotipos que fácilmente dan alta respuesta androgénica - alto número de estructuras androgénicas inducidas y plantas regeneradas. (Wedzony *et al*, 2009)

### **6.3 El efecto de las auxinas sobre la eficiencia de androgénesis**

Los factores que influyen el proceso de la androgénesis incluyen también la composición del medio de cultivo. En sus estudios, Bernard y Charmet (1985) demostraron que los medios tuvieron un impacto significativo en el curso del cultivo. El efecto del medio de cultivo sobre la efectividad de la androgénesis también es confirmado por nuestros propios estudios, donde se obtuvieron diferentes resultados de inducción androgénica para los mismos genotipos cultivados en las mismas condiciones, pero en diferentes composiciones de medios.

En el presente estudio, en cultivos de anteras de yuca han sido probadas varias combinaciones de las auxinas, tales como 2,4-D y el picloramo. El impacto de la combinación de análogos de auxina fue significativo. Estos estudios también demostraron clara interacción del genotipo y de la composición de auxinas. El medio suplementado con 20 mg/L picloramo (P20) dio la mejor respuesta de inducción androgénica. Tal concentración puede ser recomendada también para su aplicación práctica en el cultivo de anteras de yuca, cuando no es conocida la capacidad de la androgénesis de los genotipos ensayados. En el ensayo de Prasanthi el 2,4-D fue utilizado exitosamente en el cultivo de anteras de yuca en una concentración de 8 mg/L (Prasanthi *et al*, 2013) y además es la principal fitohormona usada en la inducción de embriogénesis somática en yuca (12 mg/L) (Chavarriaga *et al*, 2012).

El efecto de la composición y la concentración de auxinas utilizadas en los medios 35 de inducción se ha observado en numerosos estudios (Ślusarkiewicz-Jarzina i Ponitka 1997, Zheng i Konzak 1999, Wędzony i wsp. 2000). Prasanti

Se cree que la variable respuesta de los genotipos individuales se debe en parte a los niveles endógenos de fitohormonas en explantes cultivados (Gorbunova *et al*, 2001).

En estudios, Gorbunova et al. (2001) mostraron que las anteras de trigo que se caracterizan por altos niveles de ABA y IAA endógeno, menores concentraciones de 2,4-D en los medios de cultivo fueron más eficaces, y viceversa, una variedad con un bajo contenido de hormonas endógenas requiere una mayor concentración de 2 4-D para la inducción de androgénesis.

En cultivos de anteras de cereales en los medios de inducción las auxinas fueron utilizadas en diferentes concentraciones y combinaciones (Hoekstra i wsp. 1996, Moieni i Sarrafi 1996, Ślusarkiewicz-Jarzina i Ponitka 1997, Zheng i Konzak 1999, Wędzony i wsp. 2000).

En sus estudios Ślusarkiewicz-Jarzina y Ponitka (1997), y Marciniak et al. (2003) han utilizado con éxito 2,4-D en una concentración 2 mg/L para la inducción de androgénesis en cultivos de anteras de triticales. En contraste, los experimentos de Immonen (1996) mostraron aumento de la producción de callo embriogénico y regeneración de las plantas verdes a partir de embriones inmaduros de triticales cultivados en el medio suplementado con dicamba que en medio suplementado con 2,4-D en las mismas concentraciones. Del mismo modo, Gaj y Gaj (1996) mostraron que el dicamba es más eficaz en cultivos de anteras de cebada y triticales en comparación al 2,4-D.

del proceso de androgénesis es compleja y que la composición hormonal del medio de inducción debe ser modificada de acuerdo con el genotipo. En experimentos de tamaño masivo, aplicados al proceso de mejoramiento, no es posible seleccionar individualmente la composición del medio para el genotipo, por lo que es aconsejable utilizar un medio que ha demostrado ser eficaz en el mayor número de casos. Cuando derivamos líneas de genotipos valiosos donde se justifica más trabajo y recursos, la modificación de la composición del medio de inducción hormonal puede ser una manera de superar la dificultad de obtener resultados satisfactorios.

#### **6.4 Nivel de ploidía de estructuras androgénicas / callos en el cultivo de anteras.**

La citometría de flujo es una técnica frecuentemente usada para determinar el nivel de ploidía en los materiales vegetales cultivados *in vitro*. Especialmente en estructuras inducidas en el cultivo de anteras - cual objetivo es obtener estructuras originadas desde células gametofíticas - de origen haploides. (Ochatt et al., 2002).

Para determinar el nivel de ploidía de las estructuras obtenidas en el proceso de androgénesis de yuca en el estudio presentado se utilizó la mencionada técnica.

Todas las estructuras analizadas por este método revelaron el nivel de ploidía equivalente a 2C, que corresponde al nivel diploide y no se observó tejido en el nivel de monoploide – haploide.

En contraste en trabajos realizados por Prasanthi y Weerakoon (2006) el nivel de ploidía de todas las estructuras androgénicas originadas en el cultivo de anteras de coco fueron de nivel de ploidía 1n - haploide ( $n = x = 16$ ), mostrando nivel de ploidía gametofítico. Perera et al, (2014) en el trabajo de cultivo de anteras de yuca demostró que estructuras androgénicas inducidas en este cultivo fueron de nivel de ploidía - haploides y

mixoploides. Abdollahi et al, (2017) mostraron por citometría de flujo presencia de haploides e individuos con un nivel de ploidía 2C que corresponde a diploide.

37

Los resultados que presentan el nivel de ploidía monoploide nos regala clara información de origen del tejido analizado. La dificultad aparece con el nivel de ploidía de 2C observado en el material analizado en el presente ensayo. Lo problemático es que bajo este nivel se pueden encontrar: - estructuras inducidas de tejidos somáticos que corresponden a nivel diploide y también - estructuras inducidas de células de origen gametofítico en cuales durante el proceso de desarrollo – divisiones, ocurrió espontanea duplicación de cromosomas que en el resultado corresponde con el nivel diploide.

Por esta causa en la base de resultados obtenidos en este trabajo por análisis de citometría de flujo no es posible decir con certeza cuál es el origen de las estructuras androgénicas inducidas e el cultivo de anteras de yuca. La única forma para confirmar el verdadero origen de las estructuras inducidas en el cultivo de anteras de yuca es la aplicación de marcadores moleculares.

1. El proceso de inducción fue significativamente dependiente del genotipo y la mejor respuesta fue en el cultivo de anteras del genotipo TMS 60444.
2. El tratamiento tuvo un impacto estadísticamente significativo en la inducción de androgénesis en el cultivo de anteras de ambos genotipos de yuca. Desde todos los tratamientos aplicados, la mejor respuesta androgénica fue observada en el medio suplementado con picloramo en la concentración de 20 mg/L.
3. El resultado final de la respuesta androgénica en el cultivo de anteras fue el efecto de interacción genotipo x tratamiento lo cual fue estadísticamente significativo.
4. El análisis de nivel de ploidía demostrado por la citometría de flujo equivalente a 2C que significa nivel diploide. Por esta razón la única forma para confirmar el verdadero origen de las estructuras inducidas en el cultivo de anteras de yuca es la aplicación de marcadores moleculares, lo cual puede ser realizado en futuros estudios.

## 8. Bibliografia

- A.M., C., N.H., N., A., J., & Valle's, M. (2013). Effects of n-butanol on barley microspore embryogenesis. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, DOI 10.1007/s11240-014-0451-2.
- A.M., C., N.H., N., A., J., & Valle's, M. (2013). Effects of n-butanol on barley microspore embryogenesis. *Plant Cell Tiss Organ Cult* DOI 10.1007, 11240-014-0451-2.
- Abdollahi, M. &. (2017). Improvement in androgenic response of (*Borago officinalis* L.) borage cultured anthers using antibrowning agents and picloram. . *Turkish Journal of Biology*, 41 354-363.
- Aerni, P. M. (2006). Science and Technology for Development: The Case of the Cassava Biotechnology Network (CBN) Available at SSRN: <https://ssrn.com/abstract=1493805>. *AgBioForum*, Vol. 9, No. 1, 1-14.
- Aguilera, M. (2012). La yuca en el Caribe colombiano: De cultivo ancestral a agroindustrial. *Documentos de trabajo sobre economía regional*. Retrieved, from <http://www.banrep.gov.co/en/node/25497>., 158.
- Bagheri, N. a. (2008). Combining ability and heritability of callus induction and green plant regeneration in rice anther culture. *Biotechnology*, 287-292.
- Bernard S., C. G. (1985). Improvement of haploid production through in vitro anther culture in hexaploid triticales. . *Genetic and breeding of Triticale*, *EUCARPIA meeting, Clermont-Ferrand, 2-5 July 1984, INRA, Paris*, 305-316.

Bohanec, M. y. (2004). Haploids and Double Haploids in Plant Breeding. 40

Research Gate, University of Ljubljana. *Biotechnical Faculty Slovenia*,  
DOI:10.5772/29982.

Castillo, A. N. (2013). Effects of n-butanol on barley microspore embryogenesis.

*Plant Cell Tiss Organ Cult* DOI 10.1007/s11240-014-0451-2, 14-451.

Castillo, A. N. (2014). *Effects of n-butanol on barley microspore embryogenesis*.

11240-014-0451-2: Plant Cell Tiss Organ Cult.

Ceballos, H. C. (2012). Cassava in the Third Millenium. Modern Production,

Processing, Use and Marketing System. In: Chapter 2, . En *Cassava*

*Taxonomy and Morphology* (págs. No 377, pp. 15-29). Colombia: CIAT

Publication.

Ceballos, H. C. (2012). Cassava Taxonomy and Morphology. En C. P. 377,

*Cassava in the Third Millenium* (págs. 15-29). Chapter 2: CIAT.

Ceballos, H. F. (2007). The Use of Double-Hapliods. *International Center for*

*Tropical Agriculture*, 25-37.

Ceballos, H. F. (2007). The Use of Double-Hapliods. *International Center for*

*Tropical Agriculture*, 223.

Charmet, G. B. (1984). Diallel analysis of androgenetic plant production in

hexaploid Triticale ( $\times$ Triticosecale Wittmack). *Theoretical Applied Genetics*,

69: 55-61.

Charmet, G. B. (1984). Diallel analysis of androgenetic plant production in

hexaploid Triticale ( $\times$ Triticosecale Wittmack) . *Theoretical Applied Genetics*,

69: 55-61.

*Trop*, 56 (4): 633-641.

Cistué, L. V. (2003). Barley anther culture. In: Małuszyński M., Kasha K., Forster B.P., Szarejko I. (eds). Doubled haploid production in crop plants. *Kluwer Academic, Dordrecht*, 29–34.

Cramer, S. (1999). Laboratory techniques for determining Ploidy in Plants. *HorTechnology*, 9(4):594-596.

Darvey, N. F. (1991). A modified anther culture methodology for increasing embryoid production in wheat and triticales. *Passo Fundo, Rio Grande do Sul* (págs. 3-5). Brazil: Proceedings of the Second International Triticales Symposium.

Darvey, N. F. (1991). A modified anther culture methodology for increasing embryoid production in wheat and triticales . *Proceedings of the Second International Triticales Symposium, Passo Fundo, Rio Grande do Sul*, 3-5.

Datta, S. (2005). Androgenic haploids: Factors controlling development and its application in crop improvement. *Current Science*, 89(11): 1870-1878.

Dolezel, J. G. (2007). Estimation of nuclear DNA content in plants using flow cytometry. *Nature Protocols*, 310.

Eudes, F. A. (2005). Isolated microspore culture of Canadian 6-triticales cultivars. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 82: 233–241.

Ferrie, A. I. (2014). Isolated microspore culture of oat (*Avena sativa* L.) for the production of doubled haploids: effect of pre-culture and post-culture conditions. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 116:89–96.



Foster, B. H.-B. (2007). The resurgence of haploids in higher plants. *Science* 42

*Direct*, Vol. 12 No. 8.

Gaj, M. G. (1996). Parthenogenetic barley haploids obtained by auxins treatment.

*Journal of Applied Genetics*, 37A: 187–190.

Głowacka, K. K. (2012). Androgenesis in the Bioenergy Plant *Miscanthus sinensis*:

From Calli Induction to Plant Regeneration. *Crop Science*, 2659-2673.

Gonzales, A. (12 de Noviembre de 2016). Morfología de Plantas vasculares.

Microsporogénesis. Universidad Nacional del Nordeste, Corrientes, Argentina.

Gonzalez, J. J. (2005). Microspore development during in vitro androgenesis in

triticale. *Biologia Plantarum*, 49(1): 23-28.

Gorbunova, V. K. (2001). The Induction of Androgenesis in vitro in Spring Soft

Wheat. Balance of Exogenous and Endogenous Phytohormones. *Plant Physiology Biology Bulletin*, 28(1): 25– 30.

Hoekstra, S. v. (1996). The interaction of 2,4-D application and mannitol pre-

treatment in anther and microspore culture of *Hordeum vulgare* L. cv. Igri. *Journal of Plant Physiology*, 148: 6.

Immonen, S. (1996). Influence of media and growth regulators on somatic

embryogenesis and plant regeneration for production of primary triticales. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 44: 45-52.

Kasha, K. S. (2003). Barley isolated microspore culture protocol. In.: Małuszyński

M., Kasha K.J. Forster B.P. Szarejko I. (eds.). Doubled Haploid Production in Crop Plant. *Kluwer Acad. Publ. Dordrecht/ Boston/ Londo*, 43-48.

- kurt, O. e. (1996). Anther culture Potential of linseed (*Linum usitatissimum* L.) Effects of Gentypes and pretreatment on Callus Formation and Differentiation. *Agriculture and Forestry*, 553-560.
- kurt, O. E. (1996). Anther culture Potential of linseed (*Linum usitatissimum* L.) Effects of Gentypes and pretreatment on Callus Formation and Differentiation. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 553-560.
- Lentini, Z. M. (1997). Cultivo de anteras de arroz en el desarrollo de germoplasma. *CIAT ISBN 958-9439-92-6*, 10-96.
- Lincolnshire. (12 de Mayo de 2015). *IL 60069, U.S.A.* Obtenido de IL 60069, U.S.A.: <https://us.sysmex-flowcytometry.com/media/pdf/3a/01/27/MKT-10-1234-CyFlow-Space.pdf>
- Lukjanjuk, S. I. (1986). Triticale: production of haploid and homozygous plants . *Bajaj Y.P.S. (ed.). Biotechnology; Agriculture and Forestry, Crops Springer, Berlin/Heidelberg/New York/Tokyo*, 2: 530–543.
- Małuszyński, M. K. (2003). Doubled Haploid Production in Crop Plants. *Kluwer Academic Publishers Dordrecht/ Boston/ London*, 428.
- Małuszyński, M. K. (2003). Doubled Haploid Production in Crop Plants. *Kluwer Academic Publishers Dordrecht/ Boston/ London*, 428.
- Marciniak, K. K. (2003). The anther-culture response of triticale line x Tester progenies. *Cellular & Molecular Biology Letters*, 8: 343-351.
- Medina, R. (2003). Embriogénesis somática y regeneración de plantas de Mandioca (*Manihot esculenta* Cranz) de cultivares de interés para Argentina . *INTA Argentina RIA*, 32 (3): 143-160.

(*Manihot esculenta* Crantz) en la Subcuenca de Santa Teresa, Cusco.

*Ecología Aplicada*, 14(1), ISSN 1726-2216.

Mishra, R. R. (2016). In-vitro Androgenesis in Rice: Advantages, Constraints and Future Prospects. *ScienceDirect*, 57-68.

Moieni, A. L. (1997). Evidence for genetic control and media effect on haploid regeneration in the anther culture of hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Breeding*, 116(5): 502-504.

Moieni, A. S. (1996). The effects of gibberellic acid, phenylethylamine 2,4-D, and genotype on androgenesis in hexaploid wheat (*Triticum aestivum* ). *Cereal Research Communication*, 24: 139-145.

Murovec, y. B. (2004). Haploids and Double Haploids in Plant Breeding. *Biotechnical Faculty Slovenia*, 26-45.

Nitsch, P. J. (1969). Haploid Plants from Pollen Grains. . *Science (New York, N.Y.)*. 163. 10.1126/science.163.3862.85, 85-7.

Ochatt, S. (2006). Flow cytometry (ploidy determination, cell cycle analysis, DNA content per nucleus). *Medicago Truncatula Handbook*, 1-13.

Ochatt, S. M. (2002). The hyperhydricity of in vitro regenerants is linked with an abnormal DNA content in grass pea (*Lathyrus sativus* L.). *J. Plant Physiol*, 159: 1021-1028.

Ochoa, J. C. (2012). Embriogénesis somática y producción de callo embriogénico friable de dos cultivares de yuca (*Manihot esculenta* Crantz). *Colomb. Biotechnol. Vol. XIV No. 2*, 20-27.

- Pasqual, M. P. (2012). Flow Cytometry Applied in Tissue Culture, Federal University of Lavras (UFLA). *Department of Agriculture, Lavras, MG, Brazil*  
<http://dx.doi.org/10.5772/50986>, 57-72.
- Perera, P. I. (2008). Androgenic potential in coconut (*Cocos nucifera* L.). *Plan Cell Tiss Organ Cult*, 92: 293-302.
- Perera, P. I. (2010). Morphological aspects of coconut anther culture derived structures. *Journal of the National Science Foundation of Sri Lanka*, 38 (1): 69-74.
- Perera, P. O.-L. (2013). A milestone in the double haploid pathway of cassava (*P. Crantz*): cellular and molecular assessment of anther-derived structures. *Springer DOI 10.1007/s00709-013-0543-6*, 6.
- Perera, P. Q. (2012). Comparative morphology, biology and histology of reproductive development in three lines of *Manihot Esculenta* Crantz (Euphorbiaceae: Crotonoideae). *AoB Plants*, 5: 46.
- Perera, P. W. (2006). Recent Advances in Anther Culture of Coconut (*Cocos nucifera* L.). *Biotechnology and Sustainable Agriculture 2006 and Beyond*, 451–455.
- Philipp, A. (2006). Mobilizing Science and Technology for Development: The Case of the Cassava Biotechnology Network (CBN). *AgBioForum*, 1-14.
- Ponitki, A. Ś.-J. (1996). Anther culture response in F1 hybrids of winter wheat (*Triticum aestivum* L.). *Journal of Applied Genetics*, 37: 253-260.
- Ravi, M. C. (2010). Haploid plants produced by centromere-mediated genome elimination. *Nature*, vol. 464.

- Ravi, M. C. (2010). Haploid plants produced by centromere-mediated genome elimination. *Nature*, vol. 464. 46
- Ravi, M. C. (2010). Haploid plants produced by centromere-mediated genome elimination. *Nature*, 464.
- Robinson, J. (15 de Febrero de 2006). *Introduction to flow cytometry*. *Flow cytometry talks*. Obtenido de Purdue University Cytometry Laboratories: <http://www.cyto.purdue.edu/flowcyt/educate/pptslide.htm>
- Rossin, C. R. (2010). Effect of explant source and auxins on somatic embryogenesis of selected cassava (*Manihot esculenta* Crantz) cultivars. *Science Direct. South African Journal of Botany*, 77 (2011) 59–65.
- Ryöppy, P. (1997). Haploidy in triticales. In: Jain M.S., Sopory S.K., Veilleux R.E. (eds). *In vitro haploid production in higher plants*, 4(5): 117-131.
- Schumann, G. (1990). In vitro production of haploids in Triticale. In: Bajaj Y.P.S. *Biotechnology in Agriculture and Forestry. Wheat. Springer-Verlag, Berlin*, 13: 382-402.
- Serrata, X. C. (2014). Mediterranean japonica rice (*Oryza sativa*) cultivar improvement through anther culture. *Springer*, vol. 195:31–44 (doi:10.1007/s10681-013-0955-6).
- Sidhu, K. P. (2009). Regeneration of fertile green plants from oat isolated microspore culture. *Plant Cell Rep*, 28:571–577.
- Ślusarkiewicz-Jarzina, A. P. (1997). Effect of genotype and media composition on embryoid induction and plant regeneration from anther culture in triticales. *Journal of Applied Genetics*, 38(3): 253-258.

Sysmex, A. I. (15 de Noviembre de 2016). *CyFlow Space citómetro de flujo*. 47

Obtenido de Aptakisis Road: [www.sysmex.com/us](http://www.sysmex.com/us)

Taylor, N. E. (1996). Development of friable embryogenic callus and embryogenic suspension culture systems in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Nature Biotechnology*, 14, 726–730.

Torres, E. (13 de Octubre de 2012). *Medio de cultivo de Anteras*. Obtenido de Blogs, Biólogo: <http://biologochacaloso.blogspot.com.co/2013/04/medio-de-cultivo-de-anteras.html>

Wang, C. L. (2010). Microsporogenesis and pollen formation in cassava. *Biología Plantarum*, 55 (3): 469-478.

Wędzony, M. F.-H. (2009). Progress in Doubled Haploid Technology in Higher Plants. In: Touraev A. et al. (eds.). *Advances in Haploid Production in Higher Plants*, 1-33.

Wędzony, M. M. (2000). Major factors influencing triticales anther culture. In: Bohanec B. *Biotechnological Approaches for Utilization of Gametic Cells*, 85-89.

Zheng, M. K. (1999). Effect of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on callus induction and plant regeneration in anther culture of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Cell Reports*, 19: 69-73.

Żur, I. D. (2013). Failure of androgenesis in *Miscanthus × giganteus* in vitro culture of cytologically unbalanced microspores. *Plant Reproduction*, <http://doi.org/10.1007/s00497-013-0219-6>, 26(3), 297–307.